



# Determinação de limites de uso de solventes e emulsificantes na diluição de extratos vegetais em testes *in vitro* sobre ovos e larvas de isolado resistente de *Haemonchus contortus*

Isabela C. C. Agnoloni<sup>1\*</sup>, Bruna M. Estella<sup>1</sup>, Luciana Ferreira Domingues<sup>2</sup>, Rafaela Regina Fantatto<sup>3</sup>, Amanda Figueiredo<sup>4</sup>, Ana Carolina de Souza Chagas<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Aluna de graduação do Centro Universitário Central Paulista - UNICEP, São Carlos/SP, Bolsista PIBIC CNPq, [cabeca.isabela@gmail.com](mailto:cabeca.isabela@gmail.com); <sup>2</sup> Aluna de pós doutorado do Lab. de Sanidade Animal, bolsista FAPESP; <sup>3</sup> Aluna de Mestrado da UNESP – Araraquara/SP, Bolsista CNPq; <sup>4</sup> Aluna de Mestrado da UNESP – Jaboticabal/SP, Bolsista CNPq; <sup>5</sup> Pesquisadora, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP

## INTRODUÇÃO

*Haemonchus contortus* (Fig. 1a) é um nematoide gastrointestinal que causa séria anemia nos pequenos ruminantes (Fig. 1b), provocando perdas econômicas devido à diminuição da produção e mortalidade dos animais.

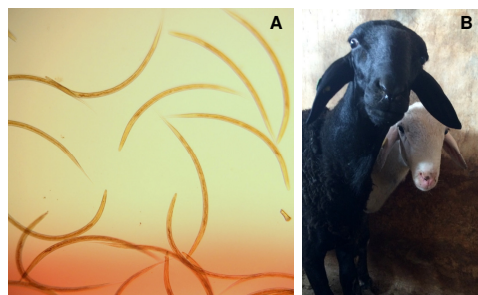


FIGURA 1. A) Larva infectante (L3) de *Haemonchus contortus*; B) Hospedeiros.

Devido à resistência desses parasitas aos anti-helmínticos comerciais, as pesquisas de novos bioativos em extratos vegetais têm se intensificado. Contudo, solventes e emulsificantes utilizados comumente para solubilizar fitoterápicos em testes *in vitro* demonstram grande toxicidade sobre os parasitas, obscurecendo os resultados efetivamente alcançados pelos extratos vegetais. Assim, este estudo buscou avaliar a toxicidade de solventes e emulsificantes utilizados na solubilização dos extratos sobre ovos e larvas do isolado resistente Embrapa 2010 de *H. contortus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 2 ovinos, Santa Inês, infectados artificialmente com o isolado resistente. As fezes foram coletadas e em seguida realizada a técnica de recuperação de ovos (Fig. 2, 3 e 4) para a execução do Teste de eclosão dos ovos (Coles et al., 1992) e de Desenvolvimento Larvar (Hubert e Kerboeuf, 1992).

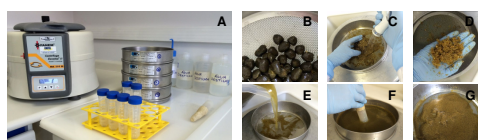


FIGURA 2. A) Materiais; B) Fezes; C) Fase 1 da recuperação; D) Fibras das fezes; E) Peneira n° 2; F) Água, ovos e fezes; G) Fezes sem ovos.

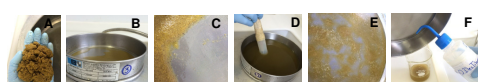


FIGURA 3. A) Fibras e fezes; B) Peneira n°3 com fezes; C) Malha da peneira n° 3; D) Início do processo na peneira n°4; E) Fim do processo na peneira n°4; F) Recuperação dos ovos.

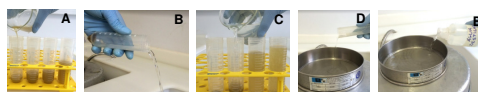


FIGURA 4. A) Ovos e fezes pós centrifugação; B) Descarte do sobrenadante; C) Adição da solução salina; D) Descarte do sobrenadante com ovos na peneira n°4 após nova centrifugação; E) Lavagem dos ovos com água destilada.

Para a realização dos testes, foram adicionados aproximadamente 100 ovos em cada poço de placas de 24 poços (Fig. 5).

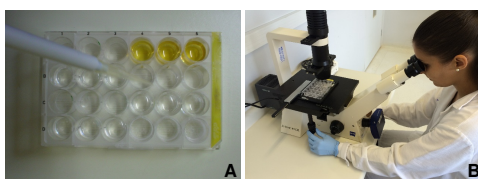


FIGURA 5. A) Adição das soluções em Placas de 24 poços; B) Leitura em microscópio invertido.

### Teste de Eclosão dos Ovos (TEO):

Foram avaliados em 6 repetições: acetato de etila, acetona, crodamol, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, metanol, sorbitol e tween 80, nas concentrações de 0,16% a 20%; sendo o crodamol também a 40% e 80%. Após 24h de incubação (estufa B.O.D. a  $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ;  $\pm 80\%\text{UR}$ ), realizou-se a contagem de ovos e larvas em cada poço (Fig. 6).

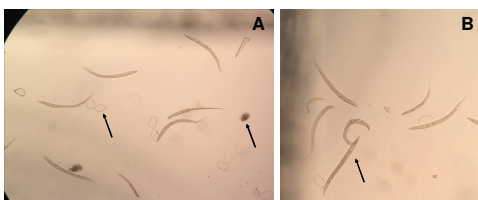


FIGURA 6. A) Cascas vazias de ovos e ovo não eclodido; B) L1 eclodidas.

### Teste de Desenvolvimento Larvar (TDL):

Após a eclosão das larvas (24h), foram adicionadas as substâncias de menor toxicidade, previamente detectadas no TEO: crodamol, DMSO, sorbitol e tween 80 (nas mesmas concentrações) + meio de cultura. Após 6 dias consecutivos de incubação, realizou-se a contagem das L1, L2 e L3 (Fig. 7). Os resultados foram analisados via Probit do SAS para estimativa das concentrações letais capazes de inibir a eclosão dos ovos ou o desenvolvimento das larvas em 10% ( $\text{CL}_{10}$ ).



FIGURA 7. A) Larvas na fase L1; B) Larva na fase L2; C) Larva na fase L3 (infectante).

## RESULTADOS

Os controles negativos apresentaram porcentagem de inibição abaixo de 10% nos testes, validando os ensaios. Buscou-se, então, solventes e emulsificantes que apresentassem inibição semelhante à dos controles. No TEO, o crodamol obteve o melhor resultado, com menos de 10% de inibição, mesmo na concentração de 80%. O DMSO, sorbitol e tween 80 podem ser utilizados no máximo à 5%. Acetona, etanol e metanol foram mais tóxicos aos ovos, podendo ser utilizados como solventes até 1,25%, enquanto acetato de etila não pode ser utilizado (Tab. 1). No TEO, as  $\text{CL}_{10}$  obtidas foram: 14,4% tween 80, 3,1% DMSO, 2,1% sorbitol, 1,5% acetona, 1,1% metanol e 0,9% etanol.

No TDL, exceto para o DMSO a 0,6% ( $\text{CL}_{10}$  1,6%), todos inibiram mais de 10% do desenvolvimento larvar em todas as concentrações e, portanto, não são substâncias indicadas para o uso.

TABELA 1. Porcentagens de inibição da eclosão dos ovos de *H. contortus* obtidas no controle negativo (C = água), solventes e emulsificantes avaliados no TEO.

| PRODUTOS | C   | CONCENTRAÇÕES |       |       |       |      |      |      |      |     |     |
|----------|-----|---------------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-----|-----|
|          |     | 0,15%         | 0,31% | 0,62% | 1,25% | 2,5% | 5%   | 10%  | 20%  | 40% | 80% |
| A. Etila | 4,5 | 11,2          | 11,6  | 12,8  | 16,3  | 77,9 | 97,0 | 99,3 | 99,3 | -   | -   |
| Acetona  | 4,8 | 1,0           | 0,8   | 3,1   | 4,2   | 23,5 | 86,0 | 94,7 | 99,4 | -   | -   |
| Crodamol | 1,0 | 1,7           | 1,8   | 4,2   | 4,4   | 1,3  | 0,6  | 3,2  | 4,8  | 2,3 | 5,2 |
| DMSO     | 0,6 | 0,3           | 0,8   | 2,3   | 5,7   | 5,6  | 3,8  | 95,3 | 99,5 | -   | -   |
| Etanol   | 3,6 | 3,4           | 3,7   | 4,0   | 4,3   | 82,6 | 92,3 | 100  | 100  | -   | -   |
| Metanol  | 4,5 | 3,1           | 3,6   | 5,6   | 6,2   | 17,3 | 82,9 | 99,1 | 100  | -   | -   |
| Sorbitol | 4,3 | 5,0           | 3,6   | 4,0   | 4,9   | 3,5  | 4,2  | 91,9 | 97,4 | -   | -   |
| Tween 80 | 0,7 | 0,5           | 0,9   | 0,5   | 0,6   | 1,0  | 0,2  | 10,5 | -    | -   | -   |

## CONCLUSÃO

Todas as substâncias que inibiram mais de 10% no TDL, não são indicadas para uso sobre as larvas por causar um falso positivo nos resultados dos extratos vegetais. Entretanto, as substâncias e concentrações recomendadas para o TEO, bem como o DMSO para o TDL, servem de referência para outros laboratórios que avaliam fitoterápicos *in vitro* em *H. contortus*, sendo necessários ajustes de acordo com a população parasitária em estudo.

## REFERÊNCIAS

COLES, G.C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F.H.M.; GEERTS, S.; KLEI, T.R.; TAYLOR, M.A.; WALLER, P.J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44: 35-44, 1992.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Records*, 130: 442-446, 1992.